



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07D 305/14	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/07881 (43) Date de publication internationale: 14 avril 1994 (14.04.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00971 (22) Date de dépôt international: 4 octobre 1993 (04.10.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/11745 5 octobre 1992 (05.10.92) FR (71) Déposant: RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeur: MARGRAFF, Rodolphe ; 16, allée du Potager, F-91170 Viry-Châtillon (FR). (74) Mandataire: PILARD, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F- 92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AU, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, NO, NZ, PL, RU, SK, UA, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD OF OBTAINING 10-DEACETYLBACCATINE III (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE LA DESACETYL-10 BACCATINE III (57) Abstract <p>Method of obtaining 10-deacetylbaccatine III from different parts of the yew tree (Taxus sp.) by extraction using a suitable organic solvent of the aqueous solution obtained after treatment of the appropriate part of the yew with water or by adsorption of the aqueous solution on a suitable substance and desorption of the 10-deacetylbaccatine III by a suitable solvent followed by selective crystallization of the 10-deacetylbaccatine III.</p> (57) Abrégé <p>Procédé d'obtention de la désacétyl-10 baccatine III à partir des différentes parties de l'if (Taxus sp.) par extraction par un solvant organique convenable de la solution aqueuse obtenue après traitement à l'eau de la partie appropriée de l'if ou par adsorption de la solution aqueuse sur un support approprié et désorption de la désacétyl-10 baccatine III par un solvant convenable puis cristallisation sélective de la désacétyl-10 baccatine III.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

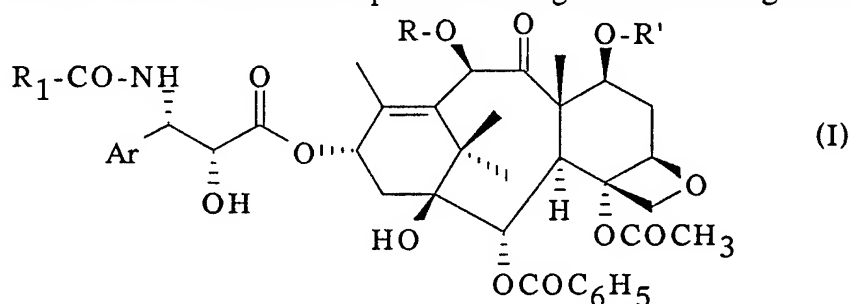
AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE D'OBTENTION DE LA DESACETYL-10 BACCATINE III

La présente invention concerne un procédé pour obtenir des intermédiaires utiles pour la préparation par des procédés semi-synthétiques du taxol, du Taxotère ou de leurs analogues à partir des différentes parties de plantes contenant ces intermédiaires.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'obtention sélective de la désacetyl-10 baccatine III à partir de l'écorce, du tronc, des racines ou des feuilles de différentes espèces d'ifs.

Le taxol et le Taxotère ainsi que leurs analogues de formule générale :



qui manifestent des propriétés anticancéreuses et antileucémiques remarquables, constituent des agents chimiothérapeutiques remarquables pour le traitement d'un certain nombre de cancers tels que par exemple les cancers du sein, de la prostate, du colon, de l'estomac, du rein ou des testicules et plus spécialement le cancer de l'ovaire.

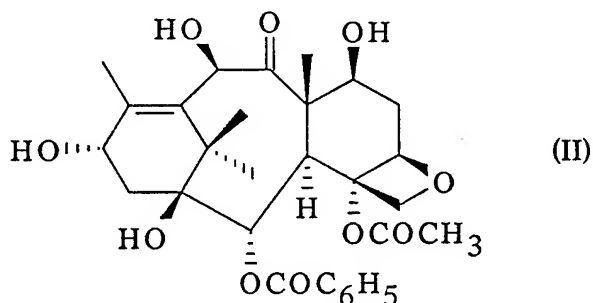
Notamment, dans la formule générale (I), Ar peut représenter un radical phényle éventuellement substitué, R peut représenter un atome d'hydrogène ou un radical acétyle ou un radical carbamoyle N-substitué, R' représente un atome d'hydrogène ou un radical carbamoyle N-substitué et R₁ peut représenter un radical phényle ou un radical R₂-O- dans lequel R₂ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle, bicycloalcoyle, phényle ou hétérocyclyle.

Le taxol correspond au produit de formule générale (I) dans laquelle Ar et R₁ représentent un radical phényle et R représente un radical acétyle et R' représente un atome d'hydrogène et le Taxotère correspond au produit de formule générale (I) dans laquelle Ar représente un radical phényle, R et R' représentent un atome d'hydrogène et R₁ représente un radical t.butoxy.

Le taxol, qui existe à l'état naturel dans différentes espèces d'ifs dans lesquelles il se trouve en faibles quantités, est difficile à isoler sans procéder à la

destruction complète de la plante. Par exemple, le taxol peut être isolé selon la méthode de C.H.O. HUANG et coll. J. Natl. Prod., 49, 665 (1986) qui consiste à traiter l'écorce broyée de *Taxus brevifolia* par le méthanol, à concentrer l'extrait, extraire le concentrat par le dichlorométhane, à concentrer à nouveau, à disperser le résidu dans un mélange hexane-acétone (1-1 en volumes), à purifier la partie soluble par chromatographie sur une colonne de Florisil pour obtenir le taxol brut qui est purifié par recristallisations successives dans des mélanges méthanol-eau et hexane-acétone puis par chromatographie et nouvelle cristallisation. Les quantités de taxol ainsi extraites peuvent représenter de 0,005 à 0,017 % de la partie de la plante mise en oeuvre.

Le Taxotère qui n'existe pas à l'état naturel peut être préparé par hémisynthèse à partir de la désacétyl-10 baccatine III de formule :



selon les procédés qui sont décrits, par exemple, dans les brevets américains US 4,814,470 ou US 4,924,012 ou dans la demande internationale PCT WO 92/09589.

Le taxol peut aussi être préparé par des procédés qui font intervenir la mise en oeuvre de la désacétyl-10 baccatine III soit par passage par l'intermédiaire du Taxotère dans les conditions décrites dans le brevet américain US 4,857,653 soit par estérification de la baccatine III dans les conditions décrites dans les brevets européens EP 400,971 ou EP 428,376 soit par estérification de la désacétyl-10 baccatine III et acétylation dans les conditions décrites dans le brevet américain US 4,924,011.

Les différentes variétés d'ifs (*Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus cupidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media*, *Taxus wallichiana*) contiennent des dérivés du taxane dont les principaux sont essentiellement le taxol et la désacétyl-10 baccatine III, les autres dérivés étant plus particulièrement la

céphalomannine, la désacétyl-10 céphalomannine ou la baccatine III éventuellement liés à des sucres.

Alors que le taxol se trouve principalement dans le tronc et l'écorce, la désacétyl-10 baccatine III est présente essentiellement dans les feuilles. Par ailleurs, la teneur en désacétyl-10 baccatine III dans les feuilles est généralement très supérieure à celle du taxol, que celui-ci soit présent dans l'écorce, le tronc ou dans les feuilles.

Il en résulte qu'il est particulièrement important de pouvoir disposer de désacétyl-10 baccatine III qui est essentielle à la préparation de quantités de taxol beaucoup plus importantes que par extraction directe à partir des ifs ainsi qu'à la préparation du Taxotère.

En extrayant la désacétyl-10 baccatine III à partir des feuilles d'ifs, on n'est pas conduit à une destruction totale de la plante dont les feuilles peuvent être utilisées à nouveau après chaque cycle de croissance.

Généralement, les méthodes connues d'extraction des dérivés du taxane contenus dans les différentes parties de l'if (écorce, tronc, racines, feuilles,) nécessitent la mise en oeuvre de techniques chromatographiques longues et coûteuses qui ne permettent pas une séparation totale et quantitative des dérivés du taxane présents initialement dans la plante.

La désacétyl-10 baccatine III peut être obtenue, avec des rendements voisins de 300 mg par kg de feuilles (*Taxus baccata*), par un procédé qui met en oeuvre une macération des aiguilles dans l'éthanol, une extraction par un solvant organique tel que le chlorure de méthylène et des chromatographies successives selon le procédé qui est décrit dans le brevet américain US 4,814,470.

Les différents constituants dérivés du taxane présents dans les différentes parties de l'if peuvent aussi être séparés par des méthodes mettant en oeuvre la chromatographie en phase liquide "reverse" qui sont décrites, en particulier dans la demande internationale PCT WO 92/07842. Ces procédés consistent essentiellement à traiter les extraits bruts d'ifs par chromatographie en phase liquide "reverse" sur un adsorbant sur lequel se fixent les dérivés du taxane, à éluier les dérivés du taxane et à les isoler. Selon ce procédé, il est possible d'isoler 200 mg de désacétyl-10 baccatine III à partir de 1 kg de feuilles broyées et séchées.

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que la désacétyl-10 baccatine III peut être extraite très sélectivement, et avec un excellent rendement, à partir des différentes parties de l'if, et plus particulièrement

des feuilles, par un procédé simple ne mettant pas en oeuvre des techniques chromatographiques. Par exemple, il est possible d'extraire environ 800 mg de désacétyl-10 baccatine III par kg de feuilles d'if (*Taxus baccata*).

Le procédé selon l'invention consiste à isoler la désacétyl-10 baccatine III à partir d'un extrait aqueux de feuilles d'if.

Plus particulièrement le procédé selon l'invention consiste,

- ou bien

- 1) à traiter par l'eau les parties broyées de l'if (*Taxus* sp.),
- 2) à séparer la solution aqueuse, contenant la désacétyl-10 baccatine III, de la masse végétale en suspension,
- 3) à extraire la désacétyl-10 baccatine III de la solution aqueuse par un solvant organique,
- 4) à séparer l'extrait organique, contenant la désacétyl-10 baccatine III, de la phase aqueuse,
- 5) à éliminer le solvant organique de l'extrait organique ainsi séparé,
- 6) à faire cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir du résidu ainsi obtenu dans un solvant organique,
- 7) à isoler la désacétyl-10 baccatine III sous forme purifiée.

- ou bien

- 1) à traiter par l'eau les parties broyées de l'if (*Taxus* sp.),
- 2) à séparer la solution aqueuse, contenant la désacétyl-10 baccatine III, de la masse végétale en suspension,
- 3) à adsorber la solution aqueuse contenant la désacétyl-10 baccatine III sur un support convenable
- 4) à désorber la désacétyl-10 baccatine III au moyen d'un solvant organique
- 5) à éliminer le solvant organique du désorbat
- 6) à faire cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir du résidu ainsi obtenu dans un solvant organique
- 7) à isoler la désacétyl-10 baccatine III sous forme purifiée

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre sur toute partie appropriée de l'if telle que l'écorce, le tronc, les racines ou les feuilles. L'if utilisé pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention appartient de préférence à la variété *Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus cupidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media* ou *Taxus wallichiana*. Il est particulièrement avantageux d'utiliser les feuilles d'if (*Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*) qui généralement sont plus

riches en désacétyl-10 baccatine III. Les fragments utilisés peuvent avoir des dimensions variant de 0,5 à quelques millimètres. Pour des questions de commodité, il peut être avantageux d'utiliser des fragments dont les dimensions moyennes sont inférieures à 1 mm. Les parties broyées, et éventuellement séchées, de l'if peuvent
5 être obtenues par des opérations de broyage, et éventuellement de séchage, qui, éventuellement, précèdent ou suivent des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante ou s'intercalent dans des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante.

Le traitement par l'eau des parties broyées de l'if est effectué selon les
10 techniques connues de l'homme de l'art. En particulier, la solution aqueuse contenant la désacétyl-10 baccatine III est généralement obtenue par agitation, à une température comprise entre 20 et 65°C, des parties broyées de l'if dans de l'eau pendant 30 minutes à 2 heures. La quantité d'eau utilisée peut varier dans de larges limites, cependant il est convenable d'utiliser une quantité d'eau de 2 à 10 litres
15 calculée par kg de partie de plante broyée et séchée et de préférence environ 5 litres d'eau par kg de partie de plante à traiter. Il peut être avantageux d'utiliser de l'eau déminéralisée pour effectuer ce traitement et d'opérer sous ultra-sons.

Dans le but d'améliorer le rendement, il peut être avantageux d'effectuer plusieurs traitements à l'eau de la masse végétale afin d'obtenir des solutions aqueuses
20 dont on extrait la désacétyl-10 baccatine III dans les conditions décrites ci-après.

La solution aqueuse obtenue contenant la désacétyl-10 baccatine III est séparée de la masse végétale par les techniques habituelles telles que la filtration, la centrifugation ou la décantation. La solution aqueuse résultante, éventuellement refroidie, peut être traitée selon l'une des manières suivantes :

25 1) la désacétyl-10 baccatine III est extraite, en une ou plusieurs fois, par un solvant organique. Les solvants organiques qui conviennent particulièrement bien sont choisis parmi les éthers tels que le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le méthyl n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther ou l'éthyl n.hexyléther et
30 les esters aliphatiques tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle ou l'acétate de t.amyle. D'un intérêt tout particulier sont le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle.

L'extraction par un solvant organique est généralement effectuée sur une
35 solution aqueuse dont le pH est inférieur à 7 et de préférence inférieur à 6.

Les extraits organiques, contenant la désacétyl-10 baccatine III, sont séparés de la phase aqueuse par application des techniques habituelles telles que la décantation.

5 Les extraits organiques sont éventuellement lavés au moyen d'une solution aqueuse d'une base faible (solution aqueuse de carbonate de sodium par exemple) et/ou à l'eau. Après séchage, le solvant organique de l'extrait est éliminé selon les méthodes habituelles et en particulier par distillation éventuellement sous pression réduite, pour donner un résidu généralement solide dont on isole la désacétyl-10 baccatine III.

10 2) la solution aqueuse est adsorbée sur un support convenable afin de fixer la désacétyl-10 baccatine III. Comme support, on utilise une résine adsorbante qui est choisie de préférence parmi les résines polystyrène-divinylbenzène.

15 La désorption de la désacétyl-10 baccatine III est effectuée par lavage du support par un solvant approprié. Comme solvant, on utilise de préférence un alcool aliphatique contenant 1 à 3 atomes de carbone et plus particulièrement le méthanol.

La solution organique est séparée du support, généralement par filtration, puis est concentrée à sec généralement par distillation éventuellement sous pression réduite pour donner un résidu généralement solide dont on isole la désacétyl-10 baccatine III.

20 La cristallisation sélective de la désacétyl-10 baccatine III brute, obtenue selon l'une ou l'autre voie, est effectuée à partir d'une solution du résidu obtenu dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques. Comme solvants permettant la cristallisation sélective de la désacétyl-10 baccatine III peuvent être avantageusement utilisés les nitriles tels que l'acétonitrile, le propionitrile ou
25 l'isobutyronitrile éventuellement en mélange avec un alcool aliphatique tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol ou le n.butanol ou un ester aliphatique tel que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle ou l'acétate de t.butyle ou une cétone aliphatique telle que l'acétone, la méthyl éthylcétone, la méthyl propylcétone, la méthyl n.butylcétone ou la méthyl isobutylcétone. Il est particulièrement
30 avantageux d'effectuer la cristallisation sélective dans l'acétonitrile éventuellement en présence d'éthanol et/ou d'acétate d'éthyle ou de n.butyle et/ou d'acétone.

La désacétyl-10 baccatine III qui précipite peut être séparée par filtration, décantation ou centrifugation.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir la désacétyl-10 baccatine III pratiquement pure avec des rendements généralement très supérieurs à ceux obtenus par la mise en oeuvre des procédés antérieurement connus. Le procédé selon l'invention permet d'extraire de façon quasiment quantitative la totalité de la
5 désacétyl-10 baccatine III contenue dans les parties de la plante utilisées et en particulier des feuilles.

La désacétyl-10 baccatine III obtenue selon le procédé d'extraction de la présente invention peut être utilisée pour préparer le taxol ou le Taxotère ou leurs dérivés dans les conditions qui sont décrites plus particulièrement dans les brevets EP
10 0 253 738, EP 0 253 739, EP 0 336 841, EP 0 336 840, WO 92 09589, EP 0 400 971 et EP 0 428 376.

Les exemples suivants illustrent le procédé selon l'invention.

EXEMPLE 1

A 2,5 litres d'eau déminéralisée chauffés à 50°C, on ajoute 500 g de feuilles
15 d'ifs (*Taxus baccata*) broyées et séchées dont la taille moyenne des particules est inférieure à 1 mm et dont le titre en désacétyl-10 baccatine III, déterminé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), est de 0,08 % (soit 400 mg de désacétyl-10 baccatine III dans 500 g de feuilles). On agite pendant 1 heure à 50°C puis on filtre.

20 Le filtrat (1,8 litre), dont le pH est de 5,4, est extrait par 3 fois 0,9 litre d'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies (2,7 litres) sont lavées 2 fois par 1 litre d'une solution de carbonate de sodium 0,1M puis par 2 fois 1 litre d'eau déminéralisée et enfin séchées sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration à sec, on obtient un solide (3,2 g) que l'on reprend par 9 cm³ d'acétonitrile à une
25 température voisine de 70°C. Après refroidissement pendant une nuit à une température voisine de +4°C, le précipité est séparé par filtration. On obtient ainsi, après séchage, 245 mg de cristaux contenant, d'après l'analyse par HPLC, 75 % de désacétyl-10 baccatine III pure, soit 183 mg. Les eaux-mères, d'après l'analyse par HPLC, contiennent 40 mg de désacétyl-10 baccatine III.

30 La masse végétale, qui a retenu 0,7 litre d'eau, est extraite 2 fois dans les conditions décrites ci-dessus. Les filtrats aqueux réunis sont traités comme précédemment. On obtient ainsi 2,5 g d'un produit solide que l'on reprend dans 5 cm³ d'acétonitrile à une température voisine de 70°C. Après refroidissement pendant une nuit à une température voisine de +4°C, on sépare par filtration 169 mg de cristaux

contenant, d'après l'analyse par HPLC, 75 % de désacétyl-10 baccatine III pure soit 127 mg. Les eaux-mères contiennent, d'après l'analyse par HPLC, 47 mg de désacétyl-10 baccatine III.

La quantité totale de désacétyl-10 baccatine III extraite par l'eau est de 183 +
5 40 + 127 + 47 = 397 mg.

Le rendement est pratiquement quantitatif.

EXEMPLE 2

On chauffe 3 litres d'eau déminéralisée à 50°C puis on ajoute 500 g de
feuilles d'ifs broyées et séchées et dont le diamètre moyen des particules est de 1 mm
10 et dont le titre en désacétyl-10 baccatine III, déterminé par chromatographie liquide à
haute performance (HPLC), est de 0,08 % (soit 400 mg de désacétyl-10 baccatine III
dans 500 g de feuilles). On agite pendant 1 heure à 50°C puis on filtre. Le filtrat
(1,97 litre), dont le pH est de 5,15, est ajusté à pH = 4,6 par addition d'acide
chlorhydrique concentré puis il est filtré sur une membrane de carton amianté dans un
15 filtre Seitz. On recueille 1,8 litre de filtrat.

On extrait 300 cm³ de filtrat par 2 fois 150 cm³ puis 4 fois 60 cm³ de
méthyl tert.butyl éther (MTBE). Les extraits réunis et concentrés fournissent 620 mg
de solides qui sont repris par 3 cm³ d'acétonitrile à 70°C.

Après refroidissement pendant une nuit à +4°C, on sépare par filtration
20 28 mg de désacétyl-10 baccatine III cristallisé dont le titre déterminé par HPLC est de
90 %. Les eaux-mères contiennent 12,8 mg de désacétyl-10 baccatine III (dosage par
HPLC).

EXEMPLE 3

On broye 1 kg de feuilles d'if (*Taxus baccata*) fraîchement coupées dont la
25 teneur en eau est de 69% et dont la teneur en désacétyl-10 baccatine III est de
651 mg/kg (détermination par HPLC) dans un mixer de 2 litres en présence d'eau
déminéralisée à raison de 10 opérations successives identiques en mettant en oeuvre
chaque fois 100 g de feuilles et 500 cm³ d'eau à une température voisine de 20°C. Le
mélange obtenu est filtré sur toile de coton puis sur papier en rinçant avec au total
30 200 cm³ d'eau. On recueille 5.000 cm³ de filtrat soit 84,9 % du volume total d'eau
(eau mise en oeuvre et eau contenue dans les feuilles). D'après le dosage par HPLC,
la solution aqueuse ainsi obtenue contient 72 g de matières sèches dont 550 mg de
désacétyl-10 baccatine III soit pratiquement la quantité théorique de 552,7 mg

(84,9 % de 651 mg). Le reste de la désacétyl-10 baccatine III contenue dans l'eau imprégnant la matière végétale peut être résupéré par lavage à l'eau de la matière végétale.

5 La solution aqueuse (5.000 cm³) est percolée sur une colonne de 5 cm de diamètre remplie sur une hauteur de 10 cm avec une résine polystyrène-divinylbenzène (Amberchrom CG 161 md[®]) (Tosohaas, Stuttgart, Allemagne).

La résine est rincée à l'eau, séchée puis mise en suspension dans du méthanol.

Après filtration et concentration à sec du filtrat, on obtient un résidu (15,5 g) que l'on reprend par 100 cm³ d'acétate d'éthyle. On sépare par filtration 8,7 g d'un
10 produit insoluble puis on concentre le filtrat jusqu'à un volume de 5 cm³. On ajoute 30 cm³ d'acétonitrile. On obtient une solution limpide dans laquelle, très rapidement, apparaissent des cristaux blancs. Après une nuit de repos à 4°C, les cristaux blancs sont séparés par filtration et séchés. On obtient ainsi 548 mg de
15 désacétyl-10 baccatine III solvatée par une mole d'acétonitrile avec un rendement de 92 %.

Un dosage par HPLC avec normalisation interne montre que ces cristaux contiennent 82 % de désacétyl-10 baccatine III.

Le rendement en désacétyl-10 baccatine III est donc de 75,4 %.

REVENDICATIONS

1 - Procédé d'obtention de la désacétyl-10 baccatine III à partir d'un extrait aqueux des différentes parties de l'if (*Taxus* sp.)

2 - Procédé de préparation de la désacétyl-10 baccatine III selon la revendication 1 caractérisé en ce que :

- 1) on traite par l'eau les parties broyées de l'if,
- 2) on sépare la solution aqueuse, contenant la désacétyl-10 baccatine III, de la masse végétale en suspension,
- 3) on extrait la désacétyl-10 baccatine III de la solution aqueuse par un solvant organique,
- 4) on sépare l'extrait organique contenant la désacétyl-10 baccatine III de la phase aqueuse,
- 5) on élimine le solvant de l'extrait organique ainsi séparé,
- 6) on fait cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir du résidu ainsi obtenu dans un solvant organique, puis
- 7) on isole la désacétyl-10 baccatine III sous forme purifiée.

3 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que :

- 1) on traite par l'eau les parties broyées de l'if (*Taxus* sp.),
- 2) on sépare la solution aqueuse, contenant la désacétyl-10 baccatine III, de la masse végétale en suspension,
- 3) on adsorbe la solution aqueuse contenant la désacétyl-10 baccatine III sur un support convenable
- 4) on désorbe la désacétyl-10 baccatine III au moyen d'un solvant organique
- 5) on élimine le solvant organique du désorbat
- 6) on fait cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir du résidu ainsi obtenu dans un solvant organique
- 7) on isole la désacétyl-10 baccatine III sous forme purifiée

4 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que les parties broyées, et éventuellement séchées, de l'if sont agitées avec de l'eau à une température comprise entre 20 et 65°C.

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que les parties broyées, et éventuellement séchées, de l'if sont obtenues par des opérations de broyage, et

éventuellement de séchage, qui, éventuellement, précèdent ou suivent des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante ou s'intercalent dans des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante.

- 5 6 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise de 2 à 10 litres d'eau par kg de partie de plante broyée et séchée.

7 - Procédé selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé en ce que l'on utilise de l'eau déminéralisée.

- 10 8 - Procédé selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé en ce que l'on opère sous ultra-sons.

9 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on sépare la solution aqueuse contenant la désacétyl-10 baccatine III de la masse végétale en suspension par filtration, centrifugation ou par décantation.

- 15 10 - Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on extrait la solution aqueuse contenant la désacétyl-10 baccatine III par un solvant organique choisi parmi les éthers et les esters aliphatiques.

- 20 11 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le solvant organique est choisi parmi le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le méthyl n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther, l'éthyl n.hexyléther, l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle et l'acétate de t.amyle.

- 25 12 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, l'acétate d'éthyle et l'acétate de n.butyle.

13 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que l'on opère avec une solution aqueuse dont le pH est inférieur à 7.

14 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse est inférieur à 6.

15 - Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on sépare l'extrait organique contenant la désacétyl-10 baccatine III de la solution aqueuse par décantation.

5 16 - Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on élimine le solvant de l'extrait organique contenant la désacétyl-10 baccatine III, éventuellement lavé au moyen d'une solution aqueuse d'une base faible et/ou à l'eau, par distillation.

17 - Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que l'élimination du solvant de l'extrait organique est effectuée par distillation sous pression réduite.

10 18 - Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'on adsorbe la solution aqueuse par percolation sur une résine.

19 - Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que la résine est une résine polystyrène-divinylbenzène.

15 20 - Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la désorption de la désacétyl-10 baccatine III de la résine est effectuée au moyen d'un solvant organique.

21 - Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que le solvant organique est choisi parmi les alcools aliphatiques contenant 1 à 3 atomes de carbone.

22 - Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que le solvant organique est le méthanol.

20 23 - Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la solution organique contenant la désacétyl-10 baccatine III est concentrée à sec.

24 - Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que la concentration est effectuée par distillation éventuellement sous pression réduite.

25 25 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on cristallise sélectivement la désacétyl-10 baccatine III, à partir du résidu obtenu après l'élimination du solvant, dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques.

26 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi les nitriles aliphatiques éventuellement en mélange avec un alcool aliphatique ou un ester aliphatique ou une cétone aliphatique.

5 27 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que les nitriles sont choisis parmi l'acétonitrile et le propionitrile.

28 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que l'alcool aliphatique est choisi parmi le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol et le n.butanol.

10 29 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que l'ester aliphatique est choisi parmi l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle et l'acétate de t.butyle.

30 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que la cétone aliphatique est choisie parmi l'acétone, la méthyl ethylcétone, la méthyl propylcétone, la méthyl n.butylcétone et la méthyl isobutylcétone.

15 31 - Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que la cristallisation sélective est effectuée dans l'acétonitrile éventuellement associé à l'éthanol et/ou l'acétate d'éthyle ou de n.butyle et/ou l'acétone.

32 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que la désacétyl-10 baccatine III est isolée par filtration, décantation ou centrifugation.

20 33 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 32 caractérisé en ce que l'on extrait la désacétyl-10 baccatine III à partir de l'écorce, du tronc, des racines ou des feuilles de l'if.

34 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 32 caractérisé en ce que l'on extrait la désacétyl-10 baccatine III à partir des feuilles de l'if.

25 35 - Procédé selon l'une des revendications 33 ou 34 caractérisé en ce que l'if appartient à la variété *Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus cuspidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media* ou *Taxus wallichiana*.

36 - Utilisation de la désacétyl-10 baccatine III obtenue selon le procédé de l'une des revendications 1 à 35 pour la préparation du taxol, du Taxotère ou de leurs dérivés.

37 - La désacétyl-10 baccatine III lorsqu'elle est obtenue par la mise en
5 oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 35.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07D305/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 49, no. 4 , July 1986 Columbus, Ohio, US, pages 665 - 669 C.H.O. HUANG, ET AL.: 'New taxanes from Taxus brevifolia, 2' cited in the application see page 667 - page 668 ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 1994

Date of mailing of the international search report

19. 01. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

ENGLISH, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00971

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE II: MECANIQUE, PHYSIQUE, CHIMIE, SCIENCES DE L'UNIVERS, SCIENCES DE LA TERRE, vol. 299, no. 15 , 21 November 1984 Montreuil, FR, pages 1039 - 1043 V. SÉNILH, ET AL.: 'Hémisynthèse de nouveaux analogues du taxol. Étude de leur interaction avec la tubuline' see page 1039, paragraph 6 -----</p>	1,3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No
PCT/FR 93/00971

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C07D305/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 49, no. 4, Juillet 1986 Columbus, Ohio, US, pages 665 - 669 C.H.O. HUANG, ET AL.: 'New taxanes from Taxus brevifolia, 2' cité dans la demande voir page 667 - page 668 --- -/--	1,2

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Janvier 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19. 01. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ENGLISH, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE II: MECANIQUE, PHYSIQUE, CHIMIE, SCIENCES DE L'UNIVERS, SCIENCES DE LA TERRE, vol. 299, no. 15 , 21 Novembre 1984 Montreuil, FR, pages 1039 - 1043 V. SÉNILH, ET AL.: 'Hémisynthèse de nouveaux analogues du taxol. Étude de leur interaction avec la tubuline' voir page 1039, alinéa 6 -----</p>	1,3